

## 重组肺炎克雷伯氏菌转化甘油为聚 3-羟基丙酸

窦一涵<sup>1</sup> 李映<sup>2</sup> 赵鹏<sup>1</sup> 范如婷<sup>1</sup> 田平芳<sup>1\*</sup>

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023)

**摘要:** 聚 3-羟基丙酸 (Poly(3-hydroxypropionate), P3HP) 是一种生物可降解及生物相容的新型聚羟基脂肪酸酯。目前已鉴定的生物均不能天然合成 P3HP。采用 PCR 克隆鼠伤寒沙门氏菌的丙醛脱氢酶 (PduP) 基因及罗尔斯通氏菌的聚羟基脂肪酸酯合成酶 (PhaC) 基因, 构建共表达载体, 转化肺炎克雷伯氏菌后获得两株重组菌。以甘油为唯一碳源进行摇瓶发酵, *pduP* 和 *phaC* 共用 *tac* 启动子的工程菌 *K. p(pET-tac-pduP-phaC)* 产生 0.054 g/L 的 P3HP, 而 *pduP* 和 *phaC* 各自独用 *tac* 启动子的工程菌 *K. p(pET-tac-pduP-tac-phaC)* 产生 0.091 g/L 的 P3HP。

**关键词:** 肺炎克雷伯氏菌; 聚 3-羟基丙酸; 甘油; 丙醛脱氢酶; 聚羟基脂肪酸酯合成酶

### 引言

当环境中碳源过剩时, 许多微生物在胞内合成聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoates, PHAs) [1-2]。PHAs 是一类由羟基脂肪酸单体聚合而成的线性聚酯。PHAs 不仅具有从坚硬质脆到柔软弹性的不同材料学性能 [3], 而且具备石化基塑料无法比拟的生物可降解性和生物相容性 [4]。由于上述优良性能, PHAs 成为医用和食品工业等领域极具前景的新型材料 [5-6]。聚 3-羟基丙酸 (poly (3-hydroxypropionate), P3HP) 是 PHA 家族的新成员 [7], 其单体 3-羟基丙酸 (3-HP) 是重要的平台化合物 [8]。化学合成 P3HP 包括内酯开环聚合和直接缩聚, 因工艺成本高及毒性而限制了研发 [9-10]。近年来 P3HP 的研究日益增多, 其工程菌发酵一般采用廉价碳源, 且无需添加昂贵前体物 [11-12]。

\*通讯作者 电子信箱: [tianpf@mail.buct.edu.cn](mailto:tianpf@mail.buct.edu.cn)

致谢: 本研究受国家自然科学基金 (21276014, 21476011) 和 863 项目 (2015AA021003) 资助。

肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 不仅能转化甘油为 3-HP, 而且生长快<sup>[13]</sup>, 因此可作为构建 P3HP 工程菌的出发菌株。2015 年, 首次报导了一株经 3-HP 途径生产 P3HP 的重组肺炎克雷伯氏菌<sup>[14]</sup>。本研究分析了 *K. pneumoniae* 的生理生化特性, 拟按图 1 所示构建工程菌, 精简了 P3HP 合成途径。以甘油为底物生产 P3HP 涉及 3 步酶催化<sup>[15]</sup>: (1) 甘油脱水酶 (DhaB) 催化甘油 (Glycerol) 生成 3-羟基丙醛 (3-HPA); (2) 丙醛脱氢酶 (PduP) 催化 3-HPA 生成 3-羟基丙酰辅酶 A (3HP-CoA); (3) 聚酯合成酶 (PhaC) 将 3HP-CoA 聚合为 P3HP (图 1)。拟以肺炎克雷伯氏菌为宿主, 异源表达鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 的丙醛脱氢酶 (PduP) 及罗尔斯通氏菌 *Ralstonia eutropha* H16 的聚酯合成酶 (PhaC), 以甘油为碳源发酵生产 P3HP。通过优化关键酶表达, 提高甘油转化率和 P3HP 的产量。

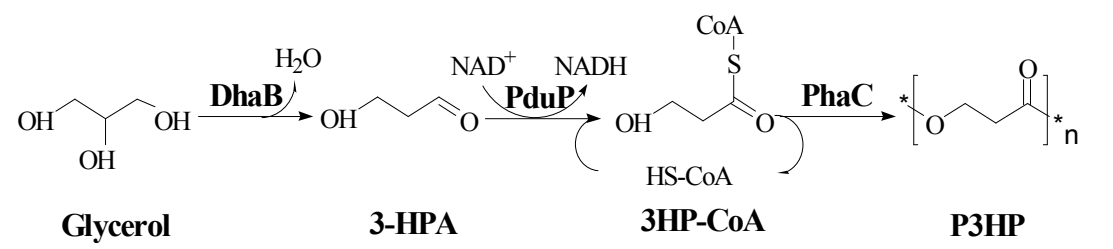


图 1 以甘油为碳源合成 P3HP 的代谢途径  
Fig. 1 Biosynthetic pathway of P3HP from glycerol

1 材料与方法

1.1 菌株、载体及引物

菌株 *K. pneumoniae* AA405, *S. enterica*, *R. eutropha* 及表达载体 pET28a 为本实验室保存。PCR 引物由北京博迈德生物技术有限公司合成 (表 1)。

表 1 菌株、载体及引物  
Table 1 Strains, vectors and primers used in this study

| 菌株、质粒及引物   | 描述/碱基序列                           | 来源/酶切位点       |
|--|-----------------------------------|---------------|
| <i>E. coli</i> Top 10                              | 感受态细胞                             | 博迈德生物公司       |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> AA405                 | 野生型肺炎克雷伯氏菌                        | 本实验室保藏        |
| <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium LT2 | 鼠伤寒沙门氏菌, 携带丙醛脱氢酶基因                | 本实验室保藏        |
| <i>Ralstonia eutropha</i> H16                      | 罗尔斯通氏菌, 携带PHA合成酶基因                | 本实验室保藏        |
| pET-tac  | 表达载体, pET-28a自身T7启动子替换为tac 启动子    | 本实验室保藏        |
| pduP-F   | CGCGGATCCATGAATACTTCTGAACTCGAAACC | <i>Bam</i> HI |

|                |                                   |                 |
|----------------|-----------------------------------|-----------------|
| <i>pduP</i> -R | CCGGAATTCCTCCTTTTAGCGAATAGAAAAGCC | <i>EcoR</i> I   |
| <i>phaC</i> -F | CCGGAATTCATGGCGACCGCAAAGGCGC      | <i>EcoR</i> I   |
| <i>phaC</i> -R | CCCAAGCTTTCATGCCTTGGCTTTGACGTATCG | <i>Hind</i> III |
| tac-F          | AATGAATTCGATCCCGCGAAATTG          | <i>EcoR</i> I   |
| tac-R          | CCGGAATTCATATCCTTCTCCTTAAAGTTAAAC | <i>EcoR</i> I   |

F-forward; R-reverse

## 1.2 主要试剂

DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司；DNA Marker、蛋白 Marker、细菌基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒购自博迈德生物技术公司；限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs (Beijing)有限公司；硫酸卡纳霉素和 3-羟基丙酸甲酯（3HP-Methyl）标准品购自宝如亿生物技术有限公司。

## 1.3 培养基及培养条件

LB 培养基（g/L）：酵母粉，5；胰蛋白胨，10；NaCl，10；固体 LB 培养基需加入 15 g/L 琼脂。甘油基本发酵培养基（g/L）：K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O，3.4；KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，1.3；(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，4；MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，0.5；CaCO<sub>3</sub>，0.1；酵母粉，3；甘油，40；微量元素，1.25 mL。微量元素（g/L）：MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O，0.1；ZnCl<sub>2</sub>，0.07；NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O，0.025；FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，1；CoCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O，0.2；CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O，0.02；Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O，0.035；硼酸，0.06；饱和盐酸，4 mL。硫酸卡纳霉素：贮存液浓度，10 mg/mL；工作浓度 50 μg/mL。

菌种活化：将保存的菌液按 1%（V/V）接种于 4 mL LB 液体培养基，37℃ 200 rpm 振荡培养 12 h。若质粒携带抗性基因，需添加工作浓度抗生素。摇瓶发酵：活化后的菌液按 1%（V/V）接种于含 100 mL 发酵培养基的锥形瓶（250 mL），封口膜封口，37℃ 200 rpm 连续培养 24 h（第 3 h 后加入诱导剂 IPTG），每 3 h 取样检测。

## 1.4 重组菌构建

基因扩增：从 GenBank 查阅 *S. enterica* serovar Typhimurium LT2 的醛脱氢酶基因（*pduP*）及 *R. eutropha* H16 的聚酯合成酶（PHA 合成酶）基因（*phaC*）序列，Primer Premier 5 设计引物（见表 1）；用试剂盒提取细菌基因组，PCR 扩增 *pduP* 和 *phaC* 基因。

重组载体 pET-tac-*pduP*-*phaC* 的构建：回收纯化 *pduP* 基因，提取质粒 pET-tac，37℃ 下双酶切 (*Bam*H I/*Eco*R I) 基因和载体 2 h，切胶回收后加 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接 4 h，热击转化至感受态细胞 *E. coli* TOP10，经菌落 PCR 及琼脂糖凝胶电泳验证，获得含 pET-tac-*pduP* 的重组菌；同样方法获得含 pET-tac-*phaC* 的重组菌；双酶切 (*Eco*R I/*Hind* III) 上述两种质粒，以 pET-tac-*pduP* 为骨架，于 *pduP* 下游插入 *phaC*，构建含两个关键酶基因的重组载体 pET-tac-*pduP*-*phaC*。

重组载体 pET-tac-*pduP*-tac-*phaC* 的构建：以 pET-tac 为模板，PCR 扩增 tac 启动子，用 *Eco*R I 单酶切 pET-tac-*pduP*-*phaC* 和 tac，在 *pduP* 和 *phaC* 基因之间插入 tac 启动子序列，转化感受态细胞 *E. coli* TOP 10，筛选阳性克隆。载体构建思路如图 2。

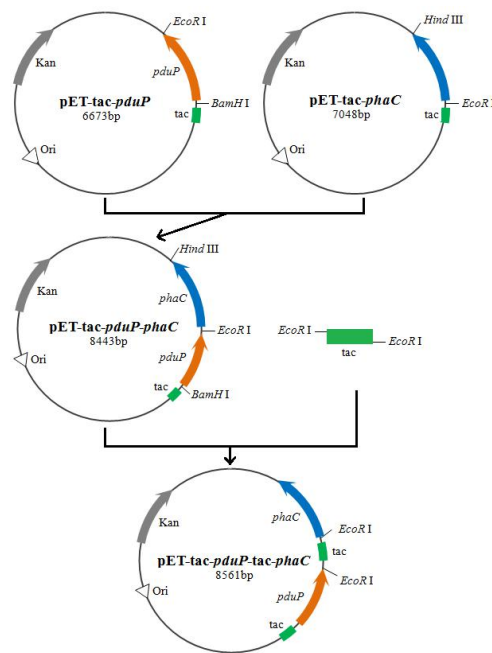


图 2 重组质粒构建示意图

Fig.2 Diagram of vector construction for P3HP synthesis

重组菌构建：提取重组载体 pET-tac-*pduP*-*phaC* 和 pET-tac-*pduP*-tac-*phaC*，电击转化感受态 *K. pneumoniae*，涂布含硫酸卡那霉素的固体平板，菌落 PCR 及琼脂糖凝胶电泳验证，获得重组菌 *K. p*(pET-tac-*pduP*-*phaC*) 和 *K. p*(pET-tac-*pduP*-tac-*phaC*)，保存备用。

### 1.5 重组菌发酵

对以下 4 株菌进行 24 h 摇瓶发酵：*K. p*(pET-tac-*pduP*-*phaC*)、*K. p*(pET-tac-*pduP*-tac-*phaC*)、野生型 (*K. p* WT) 和空质粒对照 *K. p*(pET-tac)。每 3 h 各自取样 2 mL，测定 OD<sub>600</sub> 及甘油剩余量，绘制细菌生长及甘油消耗曲线。另取 24 h 时的发酵液，通过 SDS-PAGE 验证蛋白表达情况。

P3HP 的检测：用气相色谱测定 P3HP<sup>[16]</sup>。取 2 mL 24 h 发酵液，离心，洗涤得菌体；加氯仿、甲醇-硫酸溶液（甲醇：硫酸=85：15）各 1 mL；99℃水浴锅回流加热 4 h；冷却至室温后加 1 mL 无菌水，漩涡振荡 30 s，静置分层，取下层氯仿层，即为待测样品；以 3HP-Methyl 标准品为对照，GC 检测。检测条件：初始 90℃，保持 3 min，10℃/min 升温至 180℃，保持 5 min。为进一步验证结果，采用气相色谱-质谱联用（GC-MS）对样品组分进行测定。

## 2 结果与讨论

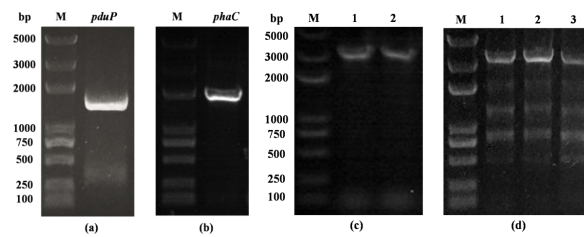
### 2.1 重组菌的构建

PCR 克隆鼠伤寒沙门氏菌的 *pduP* 基因（1395 bp），电泳如图 3(a) 所示，1500 bp 附近有一清晰的条带，酶切，连接并转化感受态细胞，经菌落 PCR 验证，构建得到含有 *pduP* 的载体 pET-tac-*pduP*。同样方法克隆罗尔斯通氏菌的 PHA 合成酶基因 *phaC*（1770 bp），如图 3(b) 所示，2000 bp 附近有一清晰条带，构建载体 pET-tac-*phaC*。测序结果经 DNAMAN 软件比对分析，发现与目标序列一致，可用于蛋白表达。

双酶切（*EcoR* I/*Hind* III）处理 pET-tac-*pduP* 和 pET-tac-*phaC*，再经连接、转化、菌落 PCR 验证，得到同时携带 *pduP* 和 *phaC* 的重组载体 pET-tac-*pduP*-*phaC*，如图 3(c) 所示，在 3000 bp 附近有目标条带，表明质粒上同时携带 *pduP* 和 *phaC*。

在一个阅读框中串联表达多个基因时，后面基因的表达通常较弱。因此在 *pduP* 和 *phaC* 之间通过 *EcoR* I 位点插入包含操纵基因的 tac 启动子序列，使两个基因的表达受独立操纵基因控制。成功构建表达载体 pET-tac-*pduP*-tac-*phaC*，如图 3(d) 所示，在 3000 bp 附近有目标条带，避免了 PHA 合成酶基因 *phaC* 表达受抑制的可能性。

提取上述两种重组载体，电击转化至 *K. pneumoniae*，构建重组工程菌 *K. p*(pET-tac-*pduP*-*phaC*) 和 *K. p*(pET-tac-*pduP*-tac-*phaC*)，保存备用。



(a) *pduP* PCR 电泳图; (b) *phaC* PCR 电泳图; (c) 重组质粒 pET-tac-*pduP-phaC* 菌落 PCR 电泳图, 泳道 1、2 为阳性克隆; (d) 重组质粒 pET-tac-*pduP-tac-phaC* 菌落 PCR 电泳图, 泳道 1、2、3 为阳性克隆; M-DNA marker DL2000plus。

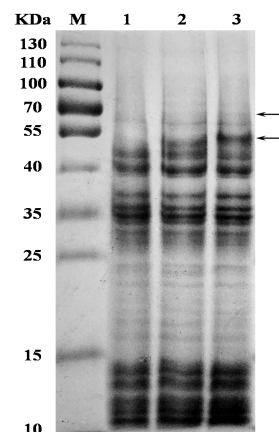
图 3 基因克隆及重组质粒电泳图

Fig.3 Electrophoresis of genes and recombinant plasmids

PCR amplification of *pduP* (a) and *phaC* (b); Colony PCR analysis of recombinant plasmids pET-tac-*pduP-phaC* (c) and pET-tac-*pduP-tac-phaC* (d); M-DNA marker.

## 2.2 重组菌蛋白表达

摇瓶发酵 24 h 的菌体进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。从 SDS-PAGE 结果 (图 4) 可知, 丙醛脱氢酶 PduP (49 KDa) 在目标位置有明显条带, 表达效果较好; PHA 合成酶 (64.3 KDa) 条带浅, 表达较弱。



M-蛋白 Marker; 1-野生型对照 *K. p* WT;

2-重组菌 *K. p*(ET-tac-*pduP-phaC*); 3-重组菌 *K. p*(ET-tac-*pduP-tac-phaC*)

箭头所示: 49 KDa 为 PduP; 64.3 KDa 为 PhaC

图 4 SDS-PAGE 图

Fig.4 SDS-PAGE analysis of protein expression

M-Marker; 1-*K. p* WT; 2- *K. p*(ET-tac-*pduP-phaC*); 3- *K. p*(ET-tac-*pduP-tac-phaC*); narrows indicate PduP (49 KDa) and PhaC(64.3 KDa)

## 2.3 重组菌生长及甘油消耗

对重组菌及对照菌进行摇瓶发酵, 测吸光度 ( $OD_{600}$ ) 和甘油剩余量, 绘制生长曲线 (图 5a) 及甘油剩余量曲线 (图 5b)。通过分析和对比可知, 4 株菌



在 24 h 内的甘油消耗大致相同。从生物量可知, 重组菌 *K. p*(pET-tac-*pduP*-*phaC*)及空质粒组稍低于野生型, 推测是质粒的引入增加了负荷; 重组菌 *K. p*(pET-tac-*pduP*-tac-*phaC*)在 6 h 后生物量急剧上升, 12 h 进入平稳期, 最大值为野生型的 1.75 倍。推测原因如下: 其一, 表达的丙醛脱氢酶将对细胞有毒的 3-HPA 转化为 3HP-CoA, 而强化表达 PHA 合成酶进一步拉动代谢流, 减少了 3-HPA 累积; 其二, P3HP 是胞内大分子, 可作为碳源促进菌体生长, 因此在甘油消耗相同的条件下, 细菌表现更高的生物量; 其三, 生产 P3HP 颗粒的菌体体积发生明显变化, 可能对菌体浓度的测量造成一定干扰。

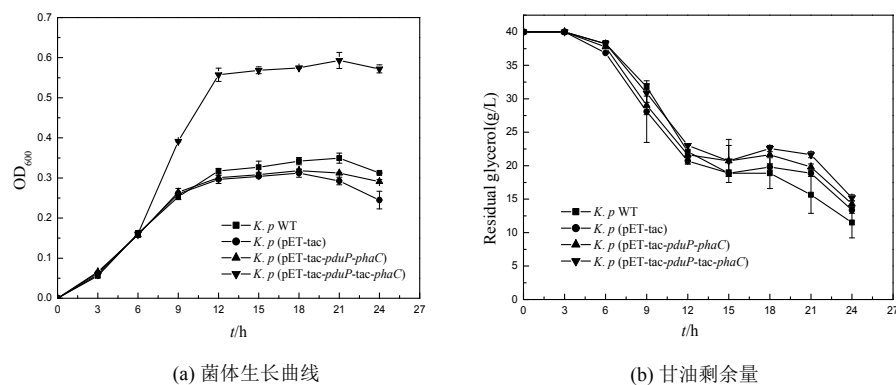


图 5 菌体生长及甘油剩余量曲线图  
Fig.5 Growth and residual glycerol of recombinant strains

## 2.4 P3HP 的检测

取发酵 24 h 的菌液, 经甲酯化反应将 P3HP 转化为 3HP-Methyl 后用气相色谱检测。如图 6 所示, (a)、(b)、(c)分别代表 3HP-Methyl 标准品、重组菌 *K. p*(pET-tac-*pduP*-*phaC*)和 *K. p*(pET-tac-*pduP*-tac-*phaC*)甲酯化样品的 GC 结果。从图 6 可知, 样品与标准品的出峰位置吻合, 出峰时间 (min) 分别为: 8.413'、8.399'、8.414', 初步认定发酵样品中含有 3HP-Methyl; 为确证此结果, 用气相色谱-质谱联用检测样品, 证实样品中对应出峰时间的物质为 3HP-Methyl, 即菌体产生了 P3HP。根据 GC 结果, 重组菌 *K. p*(pET-tac-*pduP*-tac-*phaC*) 出峰面积大于 *K. p*(pET-tac-*pduP*-*phaC*), 与预期相符, 即独立阅读框的引入, 使 PHA 合成酶表达量增加, P3HP 产量也相应增加。

## 2.5 P3HP 产量

以氯仿为溶剂配制浓度为 10、8、5、4、2、1 及 0.5 (g/L) 的 3HP-Methyl 标准品溶液, GC 检测, 绘制标准曲线 (图 7), 峰面积计算样品中的 3HP-

Methyl 含量，并换算为重组菌 *K. p*(pET-tac-*pduP*-*phaC*)和 *K. p*(pET-tac-*pduP*-tac-*phaC*) 的 P3HP 产量，分别为 0.054 g/L 及 0.091 g/L。

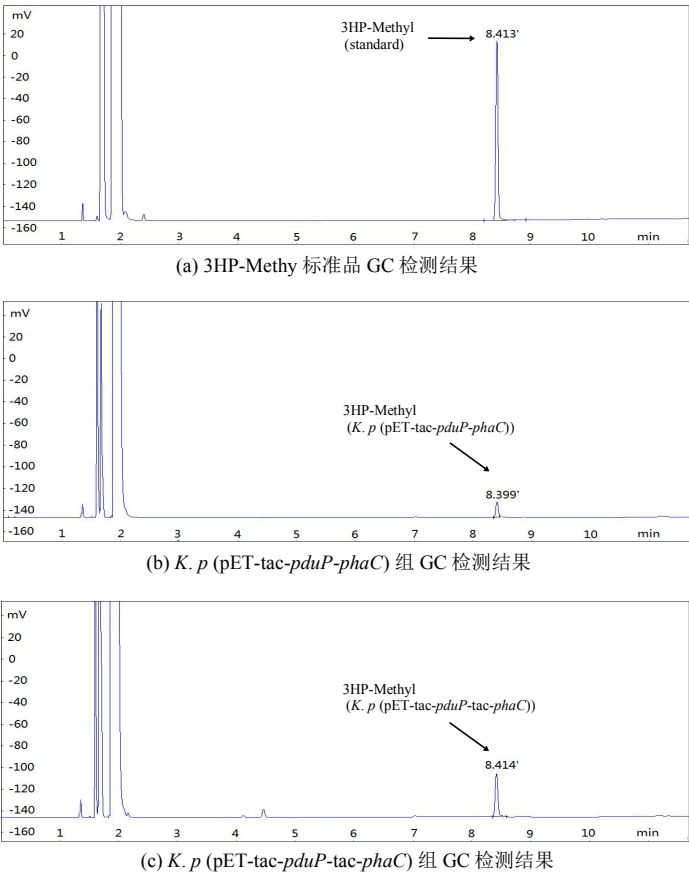


图 6 气相色谱检测结果  
Fig.6 Results of gas chromatography

GC results of 3HP-Methyl standard (a), *K. p*(pET-tac-*pduP*-*phaC*) (b) and *K. p*(pET-tac-*pduP*-tac-*phaC*) (c).

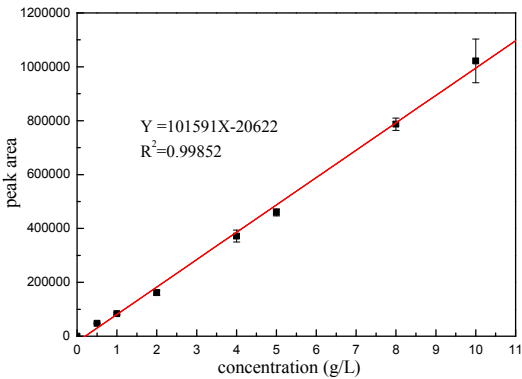


图 7 3HP-Methyl 标准曲线  
Fig.7 Standard curve of 3HP-Methyl



### 3 结论

(1) PCR 克隆了 *S. enterica* 的醛脱氢酶基因 *pduP* 和 *R. eutropha* 的 PHA 合成酶基因 *phaC*, 构建共表达载体后转化 *K. pneumoniae*, SDS-PAGE 表明表达成功。

(2) 以甘油为唯一碳源摇瓶发酵, HPLC 及气相色谱-质谱联用证实在 *K. pneumoniae* 成功构建了 P3HP 的合成途径。

(3) *pduP* 和 *phaC* 共用 *tac* 启动子的工程菌 *K. p(pET-tac-pduP-phaC)* 产生 0.054 g/L 的 P3HP, 而 *pduP* 和 *phaC* 各自独用 *tac* 启动子的工程菌 *K. p(pET-tac-pduP-tac-phaC)* 产生 0.091 g/L 的 P3HP。后者是前者 P3HP 产量的 1.69 倍。

## Metabolic Engineering of *Klebsiella pneumoniae* for the Production of Poly(3-Hydroxypropionate) from Glycerol

DOU Yi-han<sup>1</sup> LI Ying<sup>2</sup> ZHAO Peng<sup>1</sup> FAN Ru-ting<sup>1</sup> TIAN Ping-fang<sup>1\*\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029; 2. College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China)

**Abstract:** Poly(3-hydroxypropionate) (P3HP) represents a novel biodegradable and biocompatible polyhydroxyalkanoate. None of currently identified organisms can naturally synthesize P3HP. Two recombinant *Klebsiella pneumoniae* strains for the production of P3HP were constructed. The propionaldehyde dehydrogenase gene (*pduP*) from *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2 and the polyhydroxyalkanoate synthase gene (*phaC*) from *Ralstonia eutropha* H16 were cloned by PCR and cloned into vectors. Transformation of vectors into competent *K. pneumoniae* cells led to two recombinant strains: *K. p(pET-tac-pduP-phaC)*, whereby *pduP* and *phaC* shared *tac* promoter, and *K. p(pET-tac-pduP-tac-phaC)*, whereby *pduP* and *phaC* were independently expressed under *tac* promoter. Using glycerol as the sole carbon source for shake flask fermentation, the strain *K. p(pET-tac-pduP-phaC)* produced 0.054 g/L of P3HP, by contrast, the strain *K. p(pET-tac-pduP-tac-phaC)* produced 0.091 g/L of P3HP.

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae*; poly(3-hydroxypropionate); glycerol;

propionaldehyde dehydrogenase; polyhydroxyalkanoate synthase

## 参考文献

- [1] Wang Y, Yin J, Chen GQ. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 30(30): 59-65.
- [2] Lee SY. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 49(1): 1-14.
- [3] Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 2000, 25(10): 1503-1555.
- [4] Poirier Y, Nawrath C, Somerville C. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Nature Biotechnology*, 1995, 13(2): 142-150.
- [5] Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 2005, 26(33): 6565-6578.
- [6] Rai R, Keshavarz T, Roether JA, et al. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2011, 72(3): 29-47.
- [7] Zhu B, Kai W, Pan P, et al. Polymorphic packing and dynamics of biodegradable poly(3-hydroxypropionate). *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(32): 9684-9692.
- [8] Li Y, Wang X, Ge X, et al. High production of 3-hydroxypropionic acid in *Klebsiella pneumoniae* by systematic optimization of glycerol metabolism. *Scientific Reports*, 2016, doi:10.1038/srep26932
- [9] Dunn EW, Lamb JR, LaPointe AM, et al. Carbonylation of ethylene oxide to  $\beta$ -propiolactone: a facile route to poly(3-hydroxypropionate) and acrylic acid. *ACS Catalysis*, 2016, 6(12): 8219-8223.
- [10] Yamashita M, Takemoto Y, Ihara E, et al. Organolanthanide-initiated living polymerizations of  $\epsilon$ -caprolactone,  $\delta$ -valerolactone, and  $\beta$ -propiolactone. *Macromolecules*, 1996, 29(5): 1798-1806.
- [11] Andreeßen B, Lange A B, Robenek H, et al. Conversion of glycerol to poly(3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(2): 622-626.
- [12] Wang Q, Liu C, Xian M, et al. Biosynthetic pathway for poly(3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology*, 2012, 50(4): 693-697.
- [13] Wang K, Wang X, Ge X, et al. Heterologous expression of aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* in *Klebsiella pneumoniae* for 3-hydroxypropionic acid production from glycerol. *Indian Journal of Microbiology*, 2012, 52(3): 478-483.

- 
- [14] Feng X, Xian M, Liu W, et al. Biosynthesis of poly (3-hydroxypropionate) from glycerol using engineered *Klebsiella pneumoniae* strain without vitamin B12. Bioengineered, 2015, 6(2): 77-81.
- [15] Gao Y, Liu C, Ding Y, et al. Development of genetically stable *Escherichia coli* strains for poly (3-hydroxypropionate) production. PloS one, 2014, 9(5): e97845.
- [16] Brandl H, Gross R A, Lenz R W, et al. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(8): 1977-1982.